

Mod. C.E. - 1-4-7

**Ministero delle Attività Produttive**  
 Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività  
 Ufficio Italiano Brevetti e Marchi  
 Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**  
 N. **MI2002 A 001854**



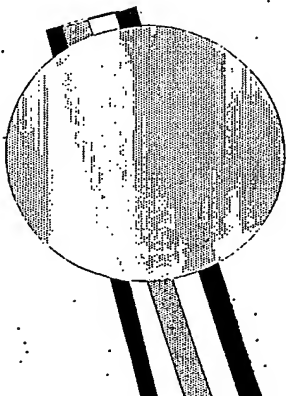
*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
 depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
 risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

*PCT/IB03/2347*  
*3/3*

**PRIORITY DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH  
 RULE 17.1(a) OR (b)

**28 LUG. 2003**

Roma, li .....



per IL DIRIGENTE  
*Paolo Piana*  
 Direttore Generale

**BEST AVAILABLE COPY**



## RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI2002A 00185

REG. A

DATA DI DEPOSITO

7/08/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ / /

## D. TITOLO

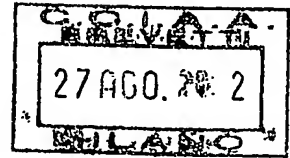
"Polisaccaride supersolfatato a basso peso molecolare"

## L. RIASSUNTO

Si descrivono LMW-K5-N,O-supersolfatati aventi un grado di solfatazione da 3,2 a 4 e un peso molecolare medio tra circa 3.000 e circa 6.000, preparabili mediante depolimerizzazione di corrispondenti K5-N,O-supersolfatati oppure a partire da LMW-K5-N-solfati mediante O-supersolfatazione di un loro sale con una base organica terziaria e successiva N-risolfatazione della LMW-K5-amina-O-supersolfatata così ottenuta. Si descrivono inoltre composizioni farmaceutiche contenenti detti LMW-K5-N,O-supersolfatati aventi attività antiangiogenetica e antivirale, in particolare anti-HIV-1.



## M. DISEGNO



Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Polisaccaride supersolfatato a basso peso molecolare".

A nome: Pasqua Oreste e Giorgio Zoppetti, domiciliati in Milano.

Inventori: Pasqua Oreste e Giorgio Zoppetti

MI 2002A 001854

\*\*\*\*\*

#### OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione concerne nuovi polisaccaridi N,O-supersolfatati a basso peso molecolare derivati dal polisaccaride K5, un procedimento per la loro preparazione, nuovi intermedi chiave di detto procedimento e composizioni farmaceutiche contenenti detti polisaccaridi supersolfatati a basso peso molecolare.

Più particolarmente, la presente invenzione si riferisce a un polisaccaride K5 N-deacetilato e N,O-solfatato avente un grado di solfatazione tra 3,2 e 4 e un peso molecolare medio tra circa 3.000 e circa 6.000.

#### CONTESTO DELL'INVENZIONE

I glicosaminoglicani come eparina, eparan solfato, dermatan solfato, condroitin solfato e acido ialuronico sono biopolimeri estratti industrialmente da vari organi animali.

In particolare, l'eparina, principalmente ottenuta mediante estrazione da mucosa intestinale di maiale o da polmone bovino, è un copolimero polidisperso con una distribuzione di peso molecolare da circa 3.000 a circa 30.000 D formato da una miscela di catene essenzialmente costituite da un acido uronico (acido glucuronico o acido iduronico) e da un aminozucchero (glucosamina) uniti da legami  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 o  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4.

Nell'eparina, l'unità uronica può essere O-solfatata in posizione 2 e l'unità glucosaminica è N-acetilata o N-solfatata, 6-O-solfatata e 3-O-solfatata in circa lo 0,5% delle unità glucosaminiche presenti.

Le proprietà e la naturale biosintesi dell'eparina nei mammiferi sono state descritte da Lindahl e al., 1986 in Lane, D. e Lindahl, U. (Editori) "Heparin. Chemical and Biological Properties; Clinical Applications", Edward Arnold, London, Pagine 159-190, da Lindahl, U, Feingold D. S. e Rodén L, 1986 TIBS, 11, 221-225 e da Conrad H. E. "Heparin Binding Proteins", Capitolo 2: Structure of Heparinoids. Academic Press, 1998.

Accanto alle attività principali anticoagulante e antitrombotica, l'eparina esercita anche attività antilipemica, antiproliferativa, antivirale, antitumorale e antimetastatica, ma il suo uso come farmaco per queste indicazioni è ostacolato dagli effetti secondari dovuti all'azione anticoagulante che può provocare emorragie.

#### STATO DELLA TECNICA

E' noto che il polisaccaride capsulare K5 isolato da ceppi di *Escherichia coli* (qui di seguito chiamato anche semplicemente "K5") descritto da W.F. Vann et al. (1981) in Eur. J. Biochem 116, 359-364, mostra la stessa sequenza del precursore dell'eparina e dell'eparansolfato (N-acetileparosano) ed è chimicamente costituito da sequenze ripetitive di unità disaccaridiche formate da acido D-glucuronico e da N-acetilglucosamina uniti con un legame  $\beta$  1-4, mentre il legame tra le diverse unità disaccaridiche D-glucuronil-N-acetilglucosamina è  $\alpha$  1-4. La sola differenza, del tutto ininfluenza sulle proprietà biologiche del

K5 e i suoi derivati, tra l'N-acetileparosano precursore dell'eparina e il polisaccaride K5 risiede nella presenza, in certe catene polisaccaridiche, di un doppio legame nella posizione 4(5) dell'estremità non riducente del K5, come per esempio riportato nei documenti EP 489647 e EP 544592 qui sotto menzionati.

Dopo questa prima divulgazione, numerose altre pubblicazioni e domande di brevetto hanno descritto la preparazione di K5 da *Escherichia coli* aventi dei pesi molecolari variabili dalle poche migliaia alle molte centinaia di migliaia di Dalton. Si citano per esempio EP 333243, IT 1230785, EP 489647, EP 544592, WO 92/17507, WO 01/02597, nonché la pubblicazione di M. Manzoni et al. (1996), Biotechnology Letters, 18(4) 383-386.

#### TECNICA ANTERIORE

I documenti EP 489647 e EP 544592 descrivono eparosani N,O-solfati di basso e di elevato peso molecolare aventi attività anticoagulante-antitrombotica, IT 1230785, WO 92/17507, WO 96/14425, WO 97/43317, WO 98/42754, WO 01/72848 e US 2002/0062019 descrivono derivati del K5, N-deacetilato-N,O-solfato aventi un certo numero di unità glucuroniche epimerizzate in C5 in unità iduroniche, ad attività antitrombotica e WO 98/09636 descrive K5-N-deacetilati-N,O-solfati ad azione antimetastatica.

Il documento US 2002/0062019 descrive un procedimento per la preparazione di epiK5-N,O-solfati, attivi sul controllo della coagulazione, aventi un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e un peso molecolare da 2.000 a 30.000, oppure da 4.000 a 8.000, oppure da

18.000 a 30.000. Il suddetto procedimento comporta i passaggi (p-a) una N-deacetilazione del polisaccaride K5 e una N-solfatazione della K5-amina risultante, (p-b) un'epimerizzazione del K5-N-solfato, (p-c) una O-supersolfatazione dell'epiK5-N-solfato, (p-d) una O-desolfatazione parziale, (p-e) una 6-O-solfatazione selettiva, (p-f) una N-solfatazione del prodotto così ottenuto, qualsiasi prodotto ottenuto al termine di uno dei passaggi (p-b)-(p-f) potendo essere sottoposto a depolimerizzazione. Detto documento descrive un epiK5-N,O-solfato avente un peso molecolare di 7.400, ottenuto mediante i passaggi (p-a)-(p-f) suddetti seguiti da una depolimerizzazione nitrosa alla fine del passaggio (p-f), a grado di solfatazione da 2,3 a 2,9.

Lo stesso documento descrive inoltre una frazione di K5 a peso molecolare di circa 5.000 che può anch'essa essere sottoposta ai passaggi (p-a) - (p-f).

La domanda di brevetto pendente n. MI2001A/00397, incorporata alla presente domanda come riferimento, descrive K5-N,O-supersolfatati aventi un grado di solfatazione superiore a 3,2, ottenuti a partire da un K5 privo di sostanze lipofile o da una sua frazione di peso molecolare di circa 5.000 mediante (a) N-deacetilazione/N-solfatazione, (b) O-supersolfatazione e (c) N-risolfatazione. Questo documento cita LMW-K5-N,O-supersolfatati aventi un peso molecolare medio da 2.000 a 5.000 ottenuti per depolimerizzazione dei K5-N,O-supersolfatati o un LMW-K5-N,O-supersolfatato di peso molecolare medio di circa 6.500 ottenuto direttamente dalla suddetta frazione di K5 attraverso i passaggi (a)-(c).



Nessuno dei suddetti documenti descrive LMW-K5-N-solfati, eventualmente epimerizzati per il 40-60%, in cui gruppi  $\text{NH}_2$  o acetile siano praticamente assenti.

Inoltre, D. Leali et al., in un articolo dal titolo "Fibroblast Growth Factor 2 Antagonist Activity and Angiostatic Capacity of Sulfated *Escherichia coli* K5 Polysaccharide Derivatives" apparso in J. Biol. Chem. 2001 (12 Ottobre), 276(41), 37900-37908 (Leali 2001), hanno descritto un K5-N,O-supersolfato, avente un peso molecolare medio di 15.000 e un grado di solfatazione di 3,84, che possiede una buona attività antiangiogenetica espressa come il 70% di inibizione della formazione di nuovi vasi entro il 12° giorno di incubazione.

Al fine di uniformare la terminologia e rendere il testo più comprensibile, nella presente descrizione si useranno termini o espressioni convenzionali, al singolare o al plurale. In particolare:

- con "K5" o "polisaccaride K5" si intende il polisaccaride capsulare da *Escherichia coli* ottenuto per fermentazione, vale a dire una miscela di catene costituite da unità disaccaridiche di acido glucuronico-N-acetilglucosamina ripetitive eventualmente contenenti un doppio legame all'estremità non riducente, come sopra illustrato, comunque preparato e purificato secondo i metodi descritti in letteratura, in particolare secondo Vann 1981, secondo Manzoni M. et al., Journal of Bioactive Compatible Polymers, 1996, 11, 301-311 ("Manzoni 1996"), secondo il metodo descritto in WO 01/72848 o nell'esempio 12 di US 2002/0062019 A1;
- il termine "epiK5" sopra menzionato come epiK5-N,O-solfato, ma che



può anche essere usato nell'espressione epiK5-N-solfato o epiK5-N,O-supersolfato, indica un K5 contenente almeno 40%, di norma 40-60%, di unità iduroniche sul totale di acidi uronici;

- con K5-amina si intende il K5 N-deacetilato per almeno il 95%;
- con "K5-N-solfato" si intende il K5 N-deacetilato e N-solfato per almeno il 95%, come descritto qui di seguito;
- con "K5-amina-O-supersolfatata" si intende una K5-amina-O-solfatata con un grado di solfatazione di almeno 2,2;
- con "K5-N,O-supersolfato" si intende una K5-amina-N,O-solfatata con un grado di solfatazione di almeno 3,2.

Inoltre:

- i termini e espressioni convenzionali qui sopra definiti si riferiscono a K5 così come isolati dopo fermentazione, generalmente con una distribuzione di pesi molecolari da circa 1.500 a circa 50.000 con un peso molecolare medio di 12.000- 25.000, vantaggiosamente di 15.000-25.000;
- salvo specifica designazione del peso molecolare, i termini e espressioni convenzionali qui sopra definiti, quando preceduti dall'acronimo "LMW" (dall'inglese "low molecular weight", basso peso molecolare), designano prodotti a basso peso molecolare aventi un peso molecolare medio fino a 12.000;
- con il termine "circa" riferito al peso molecolare si intende il peso molecolare misurato per viscosimetria  $\pm$  il peso teorico di un'unità disaccaridica, inclusiva del peso del sodio, calcolata 461 nel caso di un K5-N-solfato-derivato e 798 nel caso di un K5-N,O-supersolfato-

- derivato con grado di solfatazione 3,87;
- i termini e espressioni convenzionali come qui sopra definiti, quando sono seguiti da “-derivato” designano globalmente tanto i derivati da K5 nativo che quelli a basso peso molecolare, indipendentemente dal fatto che questi siano stati ottenuti per frazionamento del K5 e dei suoi derivati o per depolimerizzazione;
  - salvo specifica, diversa indicazione, con “grado di solfatazione” si intende il rapporto  $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$ , esprimibile anche come numero di gruppi solfato per unità disaccaridica, misurato con il metodo conduttimetrico descritto da Casu B. et al. in Carbohydrate Research, 1975, 39, 168-176 (Casu 1975);
  - salvo specifica indicazione, il peso molecolare si intende misurato mediante viscosimetria secondo Johnson et al. Carb. Res. n. 51 (1976) p. 119-127 utilizzando come standard campioni il cui peso molecolare è stato calcolato via HPLC;
  - con l'espressione “specie preponderante”, si intende il composto che, nella miscela costituente il LMW-K5-N-solfato, la LMW-K5-amina-supersolfatata o il LMW-K5-N,O-supersolfatato, è la specie più rappresentata, determinata dal picco della curva del peso molecolare misurato mediante HPLC;
  - con “condizioni di O-supersolfatazione” si intende una O-solfatazione spinta effettuata per esempio secondo il Metodo C descritto da B. Casu et al. in Carbohydrate Research, 1994, 263, 271-284 (Casu 1994);
  - con il termine “alchile” si intende un alchile lineare o ramificato, mentre con “tetrabutylammonio” si intende indicare il gruppo tetra(*n*-



butil)ammonio.

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

E' stato ora trovato che è possibile depolimerizzare un K5-N-solfato in modo da ottenere nuovi LMW-K5-N-solfati che costituiscono utili materiali di partenza per la preparazione di nuovi LMW-K5-N,O-supersolfati. Vantaggiosamente, è anche possibile ottenere nuovi LMW-K5-N-solfati a peso molecolare medio molto basso, in particolare da circa 2.000 a circa 4.000, più particolarmente specifici LMW-K5-N-solfati formati da miscele in cui il composto preponderante è un deca-saccaride oppure un dodeca-saccaride oppure un tetra-deca-saccaride. Questi nuovi LMW-K5-N-solfati sono utili intermedi per la preparazione di LMW-K5-N,O-supersolfati ad attività antivirale e/o antiangiogenetica e privi di attività sulla coagulazione.

Analogamente, è stato trovato che è possibile depolimerizzare un epiK5-N-solfato in modo da ottenere nuovi LMW-epiK5-N-solfati di peso molecolare medio da circa 2.000 a circa 4.000, più particolarmente specifici LMW-epiK5-N-solfati formati da miscele in cui il composto preponderante è un deca-saccaride oppure un dodeca-saccaride oppure un tetra-deca-saccaride. Anche questi LMW-epiK5-N-solfati, non altrimenti ottenibili, sono utili intermedi per la preparazione di LMW-epiK5-N,O-supersolfati ad attività antivirale e/o antiangiogenetica e sorprendentemente privi di attività sulla coagulazione.

Più particolarmente, è stato trovato che un LMW-K5-N,O-supersolfato, avente un peso molecolare medio tra circa 3.000 e circa

6.000, in particolare un LMW-K5-N,O-supersolfatato costituito da una miscela in cui la specie preponderante è un deca-, dodeca- o tetradecasaccaride, con un grado di solfatazione da 3,2 a 4, possiede un'attività antiangiogenetica superiore a quella del K5-N,O-supersolfatato descritto da Leali 2001.

E' stato inoltre trovato che detti nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati aventi un peso molecolare medio da circa 3.000 a circa 6.000, in particolare LMW-K5-N,O-supersolfatati costituiti da una miscela in cui la specie preponderante è un deca-, dodeca- o tetradecasaccaride, privi di attività sulla coagulazione, posseggono una buona attività sul virus HIV-1.

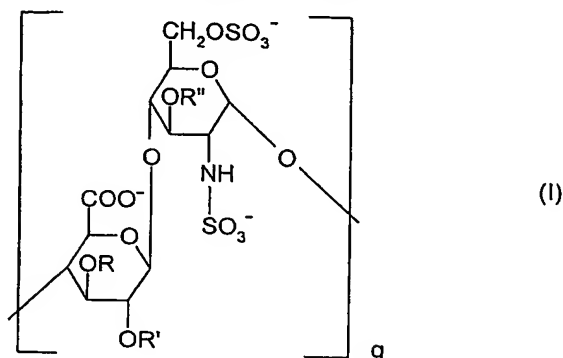
E' stato infine trovato che, a partire da LMW-K5-N-solfati, è possibile ottenere nuove LMW-K5-amine-O-solfatate con un elevato grado di solfatazione preparando il sale con una base organica terziaria o quaternaria di detto LMW-K5-N-solfato, avendo cura di lasciare la miscela di reazione a sé per un periodo di tempo di 30-60 minuti, mantenendo il pH a circa 7, e trattando poi il sale ottenuto con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione. Sottoponendo la suddetta LMW-K5-amina-O-supersolfatata a una N-solfatazione, si ottengono nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Così, secondo uno dei suoi aspetti, la presente invenzione fornisce nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati aventi un peso molecolare medio da circa 3.000 a circa 6.000 e un grado di solfatazione da 3,2 a 4, vantaggiosamente da 3,5 a 4, preferibilmente da 3,7 a 3,9.

Tra i nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati della presente invenzione, particolarmente interessanti sono quelli aventi un peso molecolare medio di 3.750-4.250, di 4.750-5.250 o di 5.750-6.250.

Composti preferenziali sono LMW-K5-N,O-supersolfatati costituiti da una miscela di catene in cui la specie preponderante ha la formula I



in cui  $q$  è 4, 5, 6, 7 o 8, R, R' e R'' rappresentano idrogeno o un gruppo  $\text{SO}_3^-$ , per un grado di solfatazione da 3,2 a 4, vantaggiosamente da 3,5 a 4, preferibilmente da 3,5 a 3,9 e il catione corrispondente è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Particolarmente interessanti sono quelli aventi un peso molecolare medio di 3.750-4.250, di 4.750-5.250 o di 5.750-6.250.

In questo contesto, il termine "chimicamente accettabile" è riferito a un catione utile nelle sintesi chimiche, come gli ioni sodio, ammonio,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ tetraalchilammonio, o per la purificazione del prodotto, mentre "farmaceuticamente accettabile" si spiega da sé.

Cationi vantaggiosi sono quelli derivati da metalli alcalini, metalli alcalino-terrosi, ammonio,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ tetraalchilammonio, alluminio e zinco. Cationi preferiti sono gli ioni sodio, calcio e tetrabutilammonio.

I LMW-K5-N,O-supersolfatati della presente invenzione possono essere preparati per depolimerizzazione di K5-N,O-supersolfatati del tipo di quello descritto in Leali 2001 e preparato con il metodo ivi illustrato.

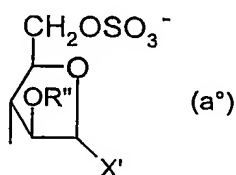
Detta depolimerizzazione viene condotta secondo i metodi noti per la depolimerizzazione dell'eparina, per esempio secondo il metodo descritto in EP 37319, in WO 82/03627 oppure secondo il metodo per la depolimerizzazione di un K5-N,O-solfato descritto in EP 544592. Preferibilmente, la depolimerizzazione, effettuata con nitrito sodico e acido cloridrico ("depolimerizzazione nitrosa"), è seguita da una riduzione *in situ* con boroidruro di sodio.

Controllando opportunamente la reazione di depolimerizzazione, in particolare utilizzando diverse quantità di nitrito sodico, si ottengono LMW-K5-N,O-supersolfatati aventi il peso molecolare desiderato.

Secondo un modo di procedere preferenziale, partendo ad esempio da 1 g di K5 N,O-supersolfatato ottenuto come descritto nella PREPARAZIONE IV qui di seguito, il prodotto di partenza viene disciolto in 100-200 ml di acqua deionizzata e termostatato a 4 °C. Si aggiunge quindi un quantitativo di sodio nitrito tale da ottenere il peso molecolare medio desiderato tra circa 3.000 e circa 6.000. Di conseguenza, partendo da un K5-N,O-supersolfatato avente un peso molecolare di 20.000 misurato con metodo HPLC equipaggiato con colonna BioRad BioSil 250 e utilizzando standard di eparina a peso molecolare noto, bisognerà aggiungere da 160 a 230 mg di sodio nitrito disciolti in una soluzione acquosa allo 0,2 %. La soluzione contenente il

K5-N,O-supersolfatato e il sodio nitrito, mantenuta a 4°C, viene portata a pH 2 tramite aggiunta di HCl 0,1 N raffreddato a 4°C. Si lascia reagire sotto lenta agitazione per 20-40 minuti, quindi si neutralizza con NaOH 0,1 N. Il prodotto ottenuto viene portato a temperatura ambiente e trattato con agente riducente come ad esempio sodio boroidruro (250-500 mg disciolti in 50-100 ml di acqua) e lasciato reagire per 4-8 ore. L'eccesso di sodio boroidruro viene eliminato portando il pH a 5-5,5 con HCl 0,1 N e lasciato a sé per altre 2-4 ore. Alla fine si neutralizza con NaOH 0,1 N e si recupera il prodotto tramite precipitazione con acetone o etanolo dopo aver concentrato il prodotto tramite evaporazione a pressione ridotta.

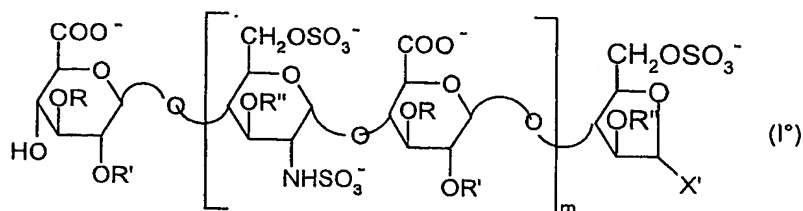
La provenienza dei LMW-K5-N,O-supersolfatati dalla depolimerizzazione nitrosa di un K5-N,O-supersolfatato e successiva eventuale riduzione con ad esempio sodio boroidruro comporta, all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene, la presenza di un'unità 2,5-anidromanno solfatata di struttura (a°)



in cui X' rappresenta formile o idrossimetile e R'' rappresenta idrogeno o SO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

In particolare, sono preferiti i LMW-K5-N,O-supersolfatati, ottenibili mediante depolimerizzazione nitrosa di un K5-N,O-supersolfatato e per

eventuale, successiva riduzione con, per esempio, boroidruro di sodio, costituiti da miscele di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula I°



dove  $m$  è 4, 5 o 6,  $R$ ,  $R'$  e  $R''$  sono idrogeno o  $\text{SO}_3^-$ ,  $X'$  è formile o idrossimetile, per un grado di solfatazione da 3,2 a 4, vantaggiosamente da 3,5 a 4, preferibilmente da 3,5 a 3,9 e il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile. Il peso molecolare medio di ciascuna miscela è vantaggiosamente 3.750-4.250, 4.750-5.250 o 5.750-6.250.

Questi nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati posseggono elevata attività antiangiogenetica con un favorevole rapporto rispetto all'attività anticoagulante globale e possono essere impiegati nella preparazione di composizioni farmaceutiche atte al trattamento di patologie angiogenesi-dipendenti a dosi in cui il rischio di effetti collaterali emorragici è estremamente ridotto.

Malattie angiogenesi-dipendenti che possono essere trattate con i LMW-K5-N,O-supersolfatati sono per esempio, tra quelle che si riscontrano nella specie umana, la retinopatia diabetica, la neovascolarizzazione della cornea trapiantata, il glaucoma neovascolare, il tracoma, la fibrodisplasia retrolentale, la psoriasi, il glaucoma piogenico, lo sviluppo della placca aterosclerotica,



emangioma ed angiofibroma, malformazioni arterovenose, artrite, e nella terapia combinatoriale dei tumori solidi.

Più particolarmente, i nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati della presente invenzione si sono dimostrati attivi nel test dell'inibizione dell'angiogenesi *in vivo* su membrana corioallantoidea (CAM) di embrione di pollo secondo Ribatti, D. et al., J. Vasc. Res., 1997, 34, 455-463 (Ribatti 1997). Secondo questo test, impianti di spugna di Gelfoam (Upjohn) sono applicati sulla CAM di embrioni di pollo all'8° giorno di sviluppo e, immediatamente dopo l'applicazione, si pipettano 3 µl di una soluzione di fisiologica salina contenenti 50 µg di LMW-K5-N,O-supersolfatato o, come prodotto di confronto, di K5-N,O-supersolfatato a peso molecolare 15.000 e grado di solfatazione 3,84 descritto in Leali 2001. Le spugne sono esaminate ogni giorno fino al 12° giorno d'incubazione. La quantificazione dell'angiogenesi viene ottenuta mediante conta del numero di vasi macroscopici osservabili intorno alla spugna ai vari giorni di sviluppo e al numero di embrioni (uova) su cui il composto è attivo. Si è osservato che il numero dei vasi che si formano intorno alla spugna impregnata di LMW-K5-N,O-supersolfatato è uguale a quelli formati intorno alla spugna impregnata di K-5-N,O-supersolfatato, ma il numero di embrioni su cui il LMW-K5-N,O-supersolfatato è attivo è superiore.

LMW-K5-N,O-supersolfatati aventi un peso molecolare medio da circa 3.000 a circa 6.000 possono essere preparati secondo un procedimento che non è descritto in letteratura e che è generalmente applicabile alla preparazione di nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati aventi un peso

molecolare medio da circa 3.000 a circa 12.000. Detto nuovo procedimento e detti nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati costituiscono ulteriori aspetti della presente invenzione.

Così, la presente invenzione fornisce anche un procedimento per la preparazione di nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati avente un grado di solfatazione da 3,2 a 4, vantaggiosamente da 3,5 a 4, preferibilmente da 3,5 a 3,9, caratterizzato dal fatto che

- (a) si tratta un LMW-K5-N-solfato, in forma acida, con una base organica terziaria o quaternaria, lasciando la miscela di reazione a sé per un periodo di tempo di 30-60 minuti, mantenendo il pH della soluzione a un valore di 7 e si isola il suo sale con detta base organica;
- (b) si tratta detto sale di base organica di detto LMW-K5-N-solfato con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione;
- (c) si tratta il prodotto così ottenuto con un reattivo di N-solfatazione e si isola il LMW-K5-N,O-supersolfato così ottenuto. Normalmente, il prodotto finale è isolato sotto forma di sale di sodio che viene eventualmente trasformato in un altro sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Come materiale di partenza per il procedimento della presente invenzione viene utilizzato un LMW-K5-N-solfato ottenuto da un K5 per N-deacetilazione praticamente totale, successiva N-solfatazione e depolimerizzazione finale con acido nitroso, seguita da riduzione, come sopra illustrato, del LMW-K5-N-solfato. Detta riduzione è necessaria dal momento che il LMW-K5-N-solfato viene successivamente sottoposto a reazioni di cui si ignora l'influenza sul gruppo formile del

radicale 2,5 anidromannosio. Anche in questo caso, controllando la reazione di depolimerizzazione come sopra illustrato, si possono ottenere LMW K5-N-solfati aventi un peso molecolare medio in tutto l'intervallo da circa 1.500 a circa 10.000, preferibilmente da circa 1.500 a circa 7.500, calcolato allo spettro  $^{13}\text{C}$ -RMN attraverso l'integrazione del segnale attribuito al C-2 del 2,5-anidromannitolo con quella del carbonio anomero della glucosamina interna alla catena polisaccaridica.

LMW-K5-N-solfati aventi un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 7.500 e i loro sali chimicamente o farmaceuticamente accettabili sono nuovi prodotti utili come intermedi e anche farmacologicamente attivi. La distribuzione di pesi molecolari di questi LMW-K5-N-solfati può essere da circa 1.000 a circa 10.000.

Analogamente, un LMW-epi-K5-N-solfato viene ottenuto da un K5 per N-deacetilazione praticamente totale, successiva N-solfatazione, C5-epimerizzazione come descritto in US 2002/0062019 e depolimerizzazione finale con acido nitroso eventualmente seguita da riduzione come sopra illustrato. Anche in questo caso, controllando la reazione di depolimerizzazione come sopra illustrato, si possono ottenere LMW-epiK5-N-solfati aventi un peso molecolare medio in tutto l'intervallo da circa 1.500 a circa 10.000, preferibilmente da circa 1.500 a circa 7.500, calcolato allo spettro  $^{13}\text{C}$ -RMN attraverso l'integrazione del segnale attribuito al C-2 del 2,5-anidromannitolo con quella del carbonio anomero della glucosamina interna alla catena polisaccaridica.



I LMW-epiK5-N-solfati aventi un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 7.500 e i loro sali chimicamente o farmaceuticamente accettabili sono nuovi prodotti utili come intermedi e anche farmacologicamente attivi. La distribuzione di pesi molecolari di questi LMW-epiK5-N-solfati può essere da circa 1.000 a circa 10.000.

Secondo un modo di procedere generale, partendo ad esempio da 1 g di K5-N-solfato o di epiK5-N-solfato, il prodotto di partenza viene disciolto in 100-200 ml di acqua deionizzata e termostato a 4 °C. Si addiziona quindi un quantitativo di sodio nitrito tale da ottenere il peso molecolare medio desiderato da circa 2.000 a circa 4.000. Di conseguenza, partendo da un K5-N-solfato o da un epiK5-N-solfato avente un peso molecolare di 20.000 misurato con metodo HPLC equipaggiato con colonna BioRad BioSil 250 e utilizzando standard di eparina a peso molecolare noto, bisognerà addizionare da 330 a 480 mg di sodio nitrito disciolti in una soluzione acquosa allo 0,2 %. La soluzione contenente il K5-N-solfato o l'epiK5-N-solfato e il sodio nitrito, mantenuta a 4°C, viene portata a pH 2 tramite aggiunta di HCl 0,1 N raffreddato a 4°C. Si lascia reagire sotto lenta agitazione per 20-40 minuti, quindi si neutralizza con NaOH 0,1 N. Il prodotto ottenuto viene portato a temperatura ambiente e trattato con agente riducente come ad esempio sodio boroidruro (250-500 mg disciolti in 50-100 ml di acqua) e lasciato reagire per 4-8 ore. L'eccesso di sodio boroidruro viene eliminato portando il pH a 5-5,5 con HCl 0,1 N e lasciato a sé per altre 2-4 ore. Alla fine si neutralizza con NaOH 0,1 N e si recupera il prodotto tramite precipitazione con acetone o etanolo dopo aver

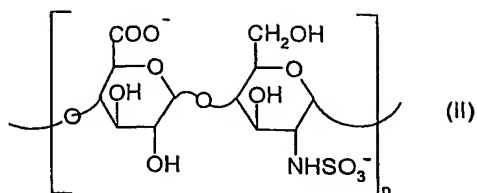
concentrato il prodotto tramite evaporazione a pressione ridotta.

Analogamente, si possono stabilire le quantità di nitrito sodico che, a partire da 1 g di K5-N-solfato o di epiK5-N-solfato, permettono di ottenere un LMW-K5-N-solfato o un LMW-epiK5-N-solfato con un peso molecolare da circa 4.000 a circa 7.500, in particolare di almeno 6.000 (6.000-7.500).

Il K5-N-solfato è ben noto in letteratura ed è descritto nei documenti citati qui sopra per illustrare lo stato della tecnica. Il suddetto materiale di partenza è invariabilmente ottenuto per N-deacetilazione del K5 e successiva N-solfatazione della K5-amina così ottenuta. Tuttavia, è stato constatato che la preparazione di un K5-N-solfato praticamente privo di gruppi acetile o  $\text{NH}_2$  viene facilitata se il K5 da cui esso viene preparato è particolarmente puro, in particolare se esso non contiene sostanze lipofile. Inoltre, è stato constatato che un K5-N-solfato preparato da un K5 privo di sostanze lipofile viene più facilmente O-supersolfato (come descritto nella domanda pendente IT MI2001A00397). E' dunque preferibile che la depolimerizzazione venga effettuata a partire da un K5-N-solfato preparato da un K5 purificato come descritto nella PREPARAZIONE I qui di seguito. Detto K5-N-solfato, il cui spettro  $^{13}\text{C}$ -RMN non mostra tracce di gruppi N-acetile o  $\text{NH}_2$  è descritto nella PREPARAZIONE II qui di seguito.

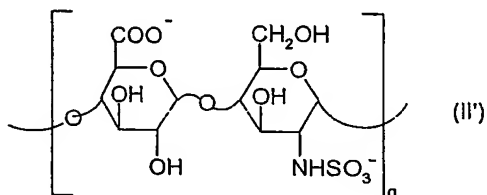
Vantaggiosi materiali di partenza del procedimento della presente invenzione sono nuovi LMW-K5-N-solfati ottenuti per depolimerizzazione nitrosa di un K5 e successiva riduzione, ad esempio con boroidruro di sodio, costituiti da miscele di catene in cui almeno

90% di dette catene ha la formula II



in cui  $n$  rappresenta un numero intero da 2 a 20 e il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

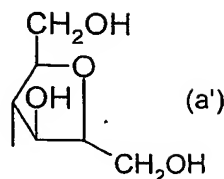
Più vantaggiosamente, i materiali di partenza sono nuovi LMW-K5-N-solfati costituiti da una miscela di catene in cui la specie preponderante ha la formula II'



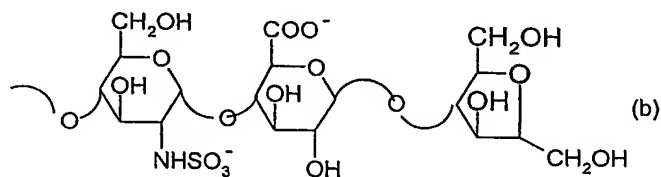
in cui  $q$  è 4, 5, 6, 7 o 8 e il catione corrispondente è chimicamente o farmaceuticamente accettabile. Questi LMW-K5-N-solfati, che costituiscono un aspetto vantaggioso dell'invenzione, sono ottenuti da un K5-N-solfato per depolimerizzazione nitrosa e successiva riduzione per esempio con boroidruro di sodio come sopra illustrato. Il loro peso molecolare medio è da circa 2.000 a circa 4.000.

La provenienza dei LMW-K5-N-solfati da un passaggio di depolimerizzazione nitrosa e successiva riduzione con ad esempio sodio boroidruro comporta, all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene, la presenza di un'unità 2,5-

anidromannitolo di struttura (a')

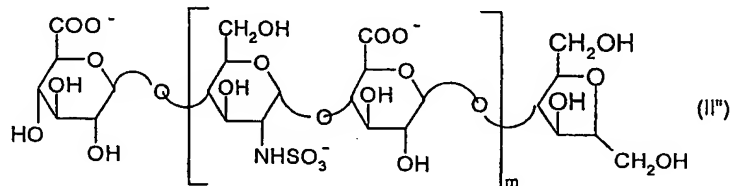


Di conseguenza, l'estremità riducente della maggioranza delle catene è in realtà rappresentata dalla struttura (b)



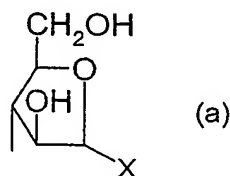
La presenza della struttura (a') non ha alcuna influenza sulle proprietà dei LMW-K5-N-solfati e dei loro derivati in quanto eventuali solfatazioni comporterebbero una possibile introduzione di uno o due gruppi solfati che non sposterebbero comunque il grado di solfatazione dei derivati O-solfatati in modo significativo. Il LMW-K5-N-solfato preferito è praticamente privo di gruppi acetile.

LMW-K5-N-solfati particolarmente vantaggiosi secondo la presente invenzione sono costituiti da miscele di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula II''



in cui m rappresenta 4, 5 o 6 e il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Secondo un altro suo aspetto, l'invenzione concerne un procedimento per la preparazione di nuovi LMW-K5-N-solfati e dei loro sali chimicamente o farmaceuticamente accettabili, caratterizzato dal fatto che si sottopone un K5-N-solfato ad una depolimerizzazione nitrosa controllata seguita eventualmente da una riduzione e si isola il prodotto così ottenuto. Detti prodotti sono di solito sotto forma di sale sodico, che può essere trasformato in un altro sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile. All'estremità riducente della maggioranza delle catene che li compongono, detti LMW-K5-N-solfati posseggono un'unità 2,5 anidromanno di struttura (a)



in cui X rappresenta formile o idrossimetile e, preferibilmente, sono costituiti da miscele di catene in cui almeno 90% di dette catene ha la formula II o da miscele di catene in cui la specie preponderante ha la formula II' o II". Questi nuovi LMW-K5-N-solfati possono essere utilizzati come principi attivi di composizioni farmaceutiche.

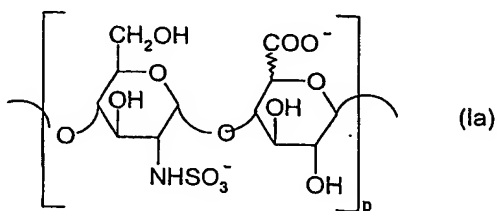
Se nella struttura (a) suddetta X rappresenta idrossimetile, i nuovi LMW-K5-N-solfati costituiscono materiali di partenza del procedimento di preparazione dei LMW-K5-N,O-supersolfatati della presente invenzione.

Vantaggiosamente, il LMW-K5-N-solfato ha una distribuzione di pesi



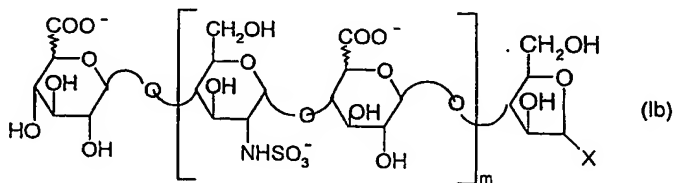
molecolari da circa 1.000 a circa 10.000.

Analogamente, sono nuovi i LMW-epiK5-N-solfati costituiti da una miscela di catene in cui la specie preponderante ha la formula Ia



in cui da 40% a 60% delle unità uroniche sono quelle dell'acido iduronic, p è un numero intero da 4 a 8 e il catione corrispondente è chimicamente o farmaceuticamente accettabile. Questi prodotti sono normalmente ottenuti da un epiK5-N-solfato per depolimerizzazione nitrosa e eventuale successiva riduzione come sopra illustrato. Il loro peso molecolare medio è da circa 2.000 a circa 4.000.

LMW-epiK5-N-solfati particolarmente vantaggiosi secondo la presente invenzione sono costituiti da miscele di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula Ib



in cui X è formile o idrossimetile, m è 4, 5 o 6, il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile e le unità glucuroniche e iduroniche sono presenti in modo alternato, partendo da un'unità glucuronica o iduronica.

I LMW-K5-N-solfati di partenza del procedimento della presente

invenzione sono preferibilmente utilizzati sotto forma di sale di sodio, a meno che non sia già disponibile un sale con una base organica terziaria o quaternaria preparato secondo il passaggio (a) sopra illustrato, preferibilmente il sale di tetrabutylammonio.

Secondo un modo di procedere vantaggioso del procedimento della presente invenzione, il passaggio (a) viene condotto facendo passare una soluzione del sale di sodio del LMW-K5-N-solfato di partenza attraverso una resina a scambio ionico acida, per esempio del tipo IR-120  $H^+$ , raccogliendo l'eluato comprendente anche le acque di lavaggio della resina e neutralizzando l'eluato con una base organica terziaria o quaternaria, preferibilmente con una soluzione acquosa di idrossido di tetrabutylammonio. La soluzione viene lasciata a sé per 1 ora, mantenendo il suo pH a 7 mediante aggiunta della stessa base e il sale così ottenuto viene isolato mediante liofilizzazione.

Nel passaggio (b), la O-supersolfatazione avviene utilizzando un eccesso di agente O-solfatante e operando a una temperatura da 20 a 70°C per un periodo di tempo fino a 24 ore in un solvente aprotico polare. Vantaggiosamente, il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-K5-N-solfato così come ottenuto nel passaggio (a), viene disciolto in dimetilformamide e trattato con 2 – 10 moli di un reattivo di O-solfatazione per ogni ossidrile libero a una temperatura di 40-60°C per 10-20 ore. Come reattivo di O-solfatazione viene vantaggiosamente usato l'addotto piridina. $SO_3$  in quantità di 2,5 – 5 moli, preferibilmente 2,5 – 4 moli per ossidrile libero per disaccaride e la reazione viene vantaggiosamente condotta a 50-60°C,

preferibilmente a 55°C per una notte. Il prodotto ottenuto al termine della reazione è isolato per addizione di 0,1-1 volume di acqua e neutralizzazione, preferibilmente con idrossido di sodio, precipitazione con una soluzione satura di cloruro sodico in acetone e filtrazione seguita da eventuale ultrafiltrazione.

Il prodotto così ottenuto è il sale preferibilmente di sodio di una LMW-K5-amina-O-supersolfatata avente un grado di solfatazione da 2,3 a 3. Il sale sodico così ottenuto può essere convertito in un altro sale. Il peso molecolare medio di un tale prodotto può essere da circa 3.500 a circa 11.000.

Nel passaggio (c), le LMW-K5-amine-O-supersolfatate vengono sottoposte a una N-solfatazione effettuata trattando una loro soluzione acquosa con carbonato sodico e un agente di N-solfatazione, per esempio un addotto (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)trialchilammina.SO<sub>3</sub> o piridina.SO<sub>3</sub>, mantenendo la miscela a 30-50°C per 8-24 ore e isolando il LMW-K5-N,O-supersolfatato per esempio mediante diafiltrazione.

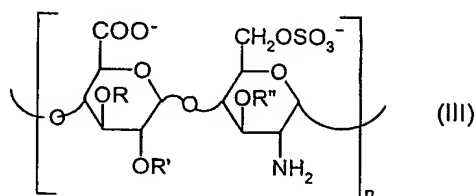
Le LMW-K5-amine-O-supersolfatate e i loro sali chimicamente o farmaceuticamente accettabili ottenibili secondo il procedimento suddetto, limitato ai passaggi (a) e (b), sono nuovi prodotti che costituiscono un ulteriore aspetto della presente invenzione. Sorprendentemente, è stato trovato che le LMW-K5-amine-O-supersolfatate, oltre a essere utili intermedi, sono anche dotate di interessanti proprietà farmacobiologiche.

Così, la presente invenzione fornisce anche nuove LMW-K5-amine-O-supersolfatate aventi un grado di solfatazione da 2,3 a 3 e i loro sali



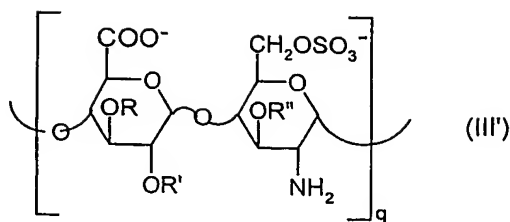
chimicamente o farmaceuticamente accettabili. Vantaggiosamente, il loro peso molecolare medio è da circa 3.500 a circa 11.000, più vantaggiosamente da circa 3.500 a circa 5.200. Preferibilmente esse sono sostanzialmente prive di gruppi N-acetile.

Se, come materiale di partenza, si usa un LMW-K5-N-solfato costituito da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula II suddetta, alla fine del passaggio (b) si ottiene una nuova LMW-K5-amina-O-supersolfatata costituita da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula III



in cui  $n$  è un numero intero da 2 a 20,  $R$ ,  $R'$  e  $R''$  rappresentano idrogeno o un gruppo  $\text{SO}_3^-$ , per un grado di solfatazione da 2,2 a 3, e il catione corrispondente è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

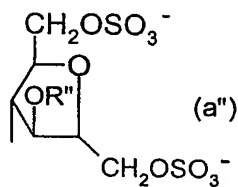
Se, come materiale di partenza, si usa un vantaggioso LMW-K5-N-solfato costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante ha la formula II', alla fine del passaggio (b) si ottiene una nuova LMW-K5-amina-O-supersolfatata costituita da una miscela di catene in cui la specie preponderante ha la formula III'



in cui  $q$  è 4, 5, 6, 7 o 8,  $R$ ,  $R'$  e  $R''$  sono come sopra definiti, il grado di solfatazione è da 2,3 a 3 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

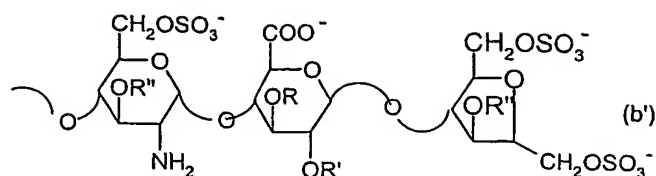
Queste LMW-K5-amina-O-supersolfatate sono nuovi prodotti utili come intermedi nella preparazione dei loro derivati N-solfati ma sono esse stesse dotate di interessanti proprietà farmacologiche, in particolare come anti-radicali liberi.

La provenienza delle nuove LMW-K5-amine-O-supersolfatate da LMW-K5-solfati ottenuti per depolimerizzazione nitrosa e successiva riduzione con, ad esempio, boroidruro di sodio, comporta all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene, la presenza di un'unità 2,5-anidromannitolo solfatata di struttura (a'')

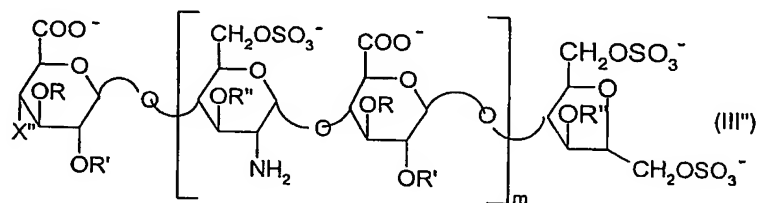


in cui  $R''$  rappresenta idrogeno o  $\text{SO}_3^-$ .

Così, l'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene è rappresentata dalla struttura (b')



Tra le nuove LMW-K5-amine-O-supersolfatate suddette, sono preferite quelle costituite da miscele in cui la specie preponderante è un composto di formula III''

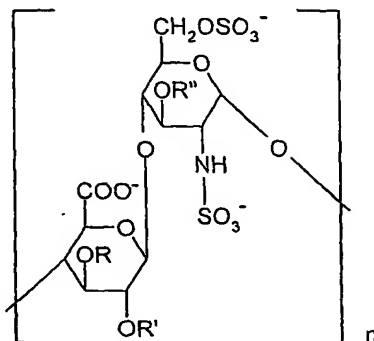


in cui R, R' e R'' sono idrogeno o  $\text{SO}_3^-$ , X'' è OH o  $\text{OSO}_3^-$ , per un grado di solfatazione da 2,2 a 3, m è 4, 5 o 6 e il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

I nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati ottenuti al termine del procedimento della presente invenzione si presentano generalmente sotto forma del loro sale sodico. Detto sale sodico può essere convertito in un altro sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile. A titolo di esempio si può effettuare uno scambio con lo ione calcio operando con membrane da ultrafiltrazione. Sali particolarmente vantaggiosi sono quelli di metalli alcalini, alcalino-terrosi, di ammonio,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ tetraalchilammonio, alluminio e zinco. Preferiti sono i sali di sodio, calcio e tetrabutylammonio.

I LMW-K5-N,O-supersolfatati ottenuti secondo il procedimento della presente invenzione sono costituiti da miscele di catene in cui almeno il

90% di dette catene ha la struttura I'

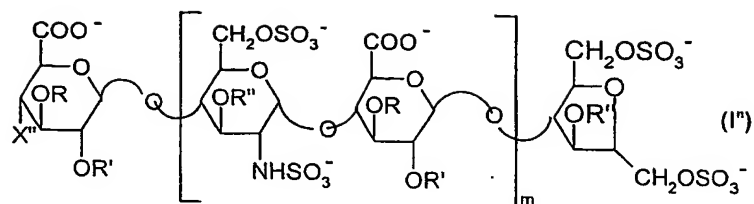


(I')

in cui n è un numero intero da 2 a 20, e R, R' e R'' rappresentano idrogeno o un gruppo  $\text{SO}_3^-$ , in cui l'estremità riducente della maggior parte di dette catene possiede la struttura (a''), per un grado di solfatazione da 3,2 a 4, vantaggiosamente da 3,5 a 4, preferibilmente da 3,5 a 3,9 e il catione corrispondente è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Tra questi LMW-K5-N,O-supersolfatati ottenuti secondo il procedimento della presente invenzione, quelli costituiti da miscele di catene in cui la specie preponderante ha la formula I e in cui l'estremità riducente della maggior parte di dette catene possiede la struttura (a'') sono particolarmente vantaggiosi.

LMW-K5-N,O-supersolfatati preferiti tra quelli ottenuti secondo il procedimento della presente invenzione sono costituiti da miscele di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula I''



in cui R, R' e R'' sono idrogeno o  $\text{SO}_3^-$ , X'' è OH o  $\text{OSO}_3^-$ , per un grado di solfatazione da 3,2 a 4, vantaggiosamente da 3,5 a 4, preferibilmente da 3,5 a 3,9, m è 4, 5 o 6 e il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

I nuovi LMW-K5-N,O-supersolfatati della presente invenzione sono interessanti come principi attivi utili in terapia in quanto posseggono attività antivirale, specialmente anti-HIV-1, e un'eccellente attività antiangiogenetica. Particolarmente interessanti sono i LMW-K5-N,O-supersolfatati con peso molecolare di 3.750-4.250 ( $m = 4$ ), di 4.750-5.250 ( $m = 5$ ) o di 5.750-6.250 ( $m = 6$ ) e grado di solfatazione da 3,5 a 3,9.

Tutti i LMW-K5-N,O-supersolfatati sopra illustrati, grazie alla loro attività antivirale e antiangiogenetica, costituiscono interessanti medicinali per il trattamento delle patologie sopra indicate. Per gli impieghi terapeutici previsti, i principi attivi della presente invenzione e i loro sali saranno formulati secondo tecniche convenzionali in adatte forme di somministrazione quali ad esempio soluzioni sterili, forme di dosaggio topiche e, in generale, in tutte quelle forme fino ad oggi proposte per derivati di tipo glicosaminoglicanico. Anche i dosaggi terapeutici saranno scelti in analogia a quelli già studiati per i composti naturali noti.



La somministrazione del principio attivo può avvenire per via orale, transcutanea o, preferibilmente parenterale, in particolare sottocutanea, intramuscolare o endovenosa oppure topica in composizioni farmaceutiche.

Nell'uomo, il dosaggio giornaliero per la somministrazione parenterale è previsto in 0,5 - 500 mg/Kg/die, vantaggiosamente in 5 - 250 mg/Kg/die, preferibilmente in 10 - 150 mg/Kg/die, mentre il dosaggio previsto per via topica è di 1 - 1000 mg/Kg/die, vantaggiosamente 10 - 500 mg/Kg/die, preferibilmente 20 - 100 mg/Kg/die.

Così, secondo un altro dei suoi aspetti, la presente invenzione concerne una composizione farmaceutica comprendente, in qualità di un suo principio attivo, una quantità farmacologicamente efficace di LMW-K5-N,O-supersolfatato, vantaggiosamente costituito da miscele di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula I, I', I'' o da miscele di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I', per un grado di solfatazione da 3,2 a 4, vantaggiosamente da 3,5 a 4, preferibilmente da 3,5 a 3,9, o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un veicolo farmaceutico. Detti LMW-K5-N,O-supersolfatati e i loro sali sono ampiamente illustrati qui sopra. Sali farmaceuticamente accettabili vantaggiosi sono quelli di sodio, potassio, calcio, magnesio, alluminio e zinco.

Nelle composizioni farmaceutiche della presente invenzione per la somministrazione orale, sottocutanea, endovenosa, transdermica o topica, i principi attivi sono preferibilmente somministrati sotto forma di unità di dosaggio, in miscela con i classici eccipienti o veicoli

farmaceutici. La posologia può variare ampiamente in funzione dell'età, del peso, e delle condizioni di salute del paziente, come pure della gravità della malattia e della via di somministrazione. Questa posologia comprende la somministrazione di una unità di dosaggio da 1 a 1000 mg, vantaggiosamente da 10 a 750 mg, preferibilmente da 250 a 500 mg da una a tre volte al giorno per via endovenosa, sottocutanea, orale, transdermica o topica.

In particolare, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica per il trattamento di patologie angiogenesi-dipendenti o per il trattamento dell'infezione da HIV che comprende, in qualità di un suo principio attivo, una quantità farmacologicamente efficace di un LMW-K5-N,O-supersolfatato, vantaggiosamente costituito da miscele di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula I, I', I'' o da miscele di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I', per un grado di solfatazione da 3,2 a 4, vantaggiosamente da 3,5 a 4, preferibilmente da 3,5 a 3,9, o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un veicolo o eccipiente farmaceutico.

Infine, la presente invenzione fornisce anche una composizione farmaceutica comprendente, in qualità di un suo principio attivo, una LMW-K5-amina-O-supersolfatata ottenibile secondo i passaggi (a) e (b) del procedimento sopra descritto, specialmente una LMW-K5-amina-O-supersolfatata avente un grado di solfatazione da 2,2 a 3, vantaggiosamente avente un peso molecolare medio da circa 3.500 a circa 11.000, più vantaggiosamente da circa 3.500 a circa 5.200, preferibilmente costituita da una miscela di catene in cui almeno il 90%

di dette catene ha la formula III o in cui la specie preponderante è un composto di formula III' o III'', o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un eccipiente farmaceutico. Preferibilmente, detta LMW-K5-amina-O-supersolfatata a grado di solfatazione da 2 a 4 è sostanzialmente priva di gruppi N-acetile.

I seguenti esempi illustrano l'invenzione.

#### PREPARAZIONE I

##### *Purificazione del K5*

In 100 ml di una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio e termostata a 4°C viene sciolto 1 g del K5 ottenuto comè descritto nei paragrafi [0251] e [0252] dell'esempio 12 di US 2002/0062019, nel cui spettro <sup>1</sup>H-RMN (Figura 3) si notano segnali dovuti a sostanze lipofile nella regione sotto 1,5 ppm. Alla soluzione così ottenuta vengono addizionati 3 volumi di isopropanolo freddo. La concentrazione salina della soluzione viene portata a 3 M mediante aggiunta della quantità calcolata di una soluzione satura di cloruro sodico e si lascia la soluzione ottenuta in ambiente freddo (circa 4°C) per una notte. Il precipitato formatosi viene separato mediante centrifugazione a 10.000 rpm per 20 minuti e la purezza del prodotto viene controllata mediante dialisi per una notte e successivo esame dello spettro <sup>1</sup>H-RMN, da cui devono essere assenti segnali nella regione sotto 1,5 ppm. Se necessario, l'operazione di dissoluzione in acqua satura di NaCl e precipitazione con isopropanolo viene ripetuta. Il precipitato viene sciolto in acqua e ultrafiltrato su membrana Miniplat Millipore cut off 10.000 D fino a scomparsa dei sali. Si ottiene così un K5 avente una



purezza di almeno 99% dal cui spettro  $^1\text{H}$ -RMN non risulta alcuna traccia di impurezze lipofile nella regione sotto 1,5 ppm.

## PREPARAZIONE II

### *Preparazione di un K5-N- solfato*

#### *(i) N-Deacetilazione*

Un grammo di polisaccaride K5 puro preparato come descritto nella PREPARAZIONE I viene solubilizzato con 100 ml di sodio idrossido 2N e la soluzione così preparata viene lasciata a 60 °C per 24 ore. La soluzione viene portata a temperatura ambiente quindi a pH neutro (pH 7) con acido cloridrico 6N.

#### *(ii) N-solfatazione*

Alla soluzione contenente il K5 deacetilato, mantenuta a 40 °C, vengono aggiunti 1,6 g di sodio carbonato e successivamente, in 4 ore, 1,6 g di piridina.solfotriossido. Alla fine della reazione, dopo 24 ore, la soluzione viene portata a temperatura ambiente, poi a pH 7,5-8 con una soluzione al 5% di acido cloridrico. Il prodotto viene purificato dai sali mediante diafiltrazione usando una membrana a spirale avvolta da 1.000 D (prepscale cartridge-Millipore). Il processo viene terminato quando la conducibilità del permeato è inferiore a 1000  $\mu\text{S}$ , preferibilmente inferiore a 100  $\mu\text{S}$ . L'intradialisi si riduce fino ad ottenere una concentrazione del polisaccaride del 10% usando lo stesso sistema da dialisi in concentrazione. La soluzione concentrata viene essiccata mediante liofilizzazione. All'analisi dello spettro  $^{13}\text{C}$ -RMN non appaiono N-acetili o  $\text{NH}_2$  residui.

## PREPARAZIONE III

*LMW-K5-N-solfato*

Il prodotto ottenuto nella PREPARAZIONE II viene depolimerizzato mediante il metodo di degradazione con acido nitroso e successiva riduzione dell'aldeide formatasi. Si procede sciogliendo 1 g di K5-N-solfato in 200 ml di acqua distillata e addizionandolo con 480 mg di sodio nitrito disciolti in 240 ml di acqua distillata. La soluzione viene quindi portata a 4°C e il pH a 2 con HCl 0,1 N e mantenuto per 30 minuti. A fine reazione la soluzione viene portata a pH 7 con NaOH 0,1 M e quindi a temperatura ambiente. La soluzione viene quindi addizionata con 450 mg. di NaBH<sub>4</sub> e lasciata reagire per 4 ore. L'eccesso di NaBH<sub>4</sub> viene eliminato con HCl portando il pH a 5-6. Il prodotto, neutralizzato con NaOH 0,1 M, viene recuperato tramite precipitazione con 3 volumi di acetone a 4°C, filtrazione con imbuto filtrante e essiccamento a 40° C in stufa a vuoto. Si ottengono 900 mg di LMW-K5-N-solfato con un peso molecolare medio di circa 2.000, costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula II'' in cui m è 4.

## PREPARAZIONE IV

*K5-N,O-supersolfato*

Un grammo di K5-N-solfato ottenuto come descritto nella PREPARAZIONE II viene disciolto in 100 ml di acqua deionizzata e la soluzione portata a 10 °C con bagno raffreddato quindi passata su resina a scambio cationico IR-120 H<sup>+</sup> o equivalente (50-200 ml). Sia la colonna che il contenitore dell'eluato sono mantenuti a 10°C. Dopo il passaggio della soluzione contenente il campione la resina viene lavata con acqua

deionizzata fino a che il pH del permeato è maggiore di 6 (circa 3 volumi di acqua deionizzata). La soluzione acida viene portata a neutralità con tetrabutylammonio idrossido (soluzione acquosa al 15%) quindi ridotta a volume minimo e liofilizzata. Il sale di tetrabutylammonio viene disciolto in 40 ml di DMF e addizionato con 3,5 g di addotto piridina.SO<sub>3</sub> in forma solida. La soluzione viene mantenuta a 50°C per 24 ore. Alla fine della reazione la soluzione viene raffreddata a temperatura ambiente e addizionata con 3 volumi di acetone saturato con sodio cloruro fino a completa precipitazione. Il precipitato viene separato dal solvente tramite filtrazione, solubilizzato con la minima quantità di acqua deionizzata (ad esempio 100 ml) e addizionato con sodio cloruro fino ad ottenere una soluzione 0,2 M. La soluzione viene portata a pH 7,5-8 con sodio idrossido 2 N e addizionata con due volumi di acetone fino a completa precipitazione. Il precipitato viene separato dal solvente tramite filtrazione. Il solido ottenuto viene solubilizzato con 100 ml di acqua deionizzata e purificato dai sali residui tramite ultrafiltrazione usando una membrana a spirale avvolta da 1.000 D (prepscale cartridge-Millipore).

La soluzione contenente il prodotto O-solfatato viene trattata come descritto in precedenza nel passaggio (ii) per l'N-solfatazione della PREPARAZIONE II. Il prodotto ha un rapporto solfati/carbossili di 3,87 misurati con tecnica conduttimetrica secondo Casu et al. , un peso molecolare medio di 20.000 misurato con tecnica HPLC a esclusione molecolare.

#### ESEMPIO 1

Un grammo di K5 N,O-supersolfatato ottenuto come descritto nella PREPARAZIONE IV viene disciolto in 200 ml di acqua deionizzata e termostatato a 4 °C. Si aggiungono quindi 230 mg di sodio nitrito disciolti in una soluzione acquosa allo 0,2 %. La soluzione contenente il K5-N,O-supersolfatato e il sodio nitrito, mantenuta a 4°C, viene portata a pH 2 tramite aggiunta di HCl 0,1 N raffreddato a 4°C. Si lascia reagire sotto lenta agitazione per 30 minuti, quindi si neutralizza con NaOH 0,1 N. La soluzione contenente il LMW-K5-N,O-supersolfatato così ottenuto, costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un decasaccaride di formula I° in cui m è 4 e X' è formile, viene portato a temperatura ambiente e trattato con 250 mg. di sodio boroidruo disciolti in 50 ml di acqua e lasciato reagire per 4 ore. L'eccesso di sodioboroidruo viene eliminato portando il pH a circa 5 con HCl 0,1 N e lasciato a sé per altre 2 ore. Alla fine si neutralizza con NaOH 0,1 N e si recupera il prodotto per precipitazione con acetone dopo aver concentrato il prodotto tramite evaporazione a pressione ridotta. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato così ottenuto mostra caratteristiche di solfatazione simili al K5-N,O-supersolfatato di partenza, un peso molecolare medio di 4.250 circa misurato tramite viscosimetria ed è costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un decasaccaride di formula I° in cui m è 4 e X' è CH<sub>2</sub>OH.

#### ESEMPIO 2

Un grammo di K5 N,O-supersolfatato ottenuto come descritto nella PREPARAZIONE IV viene trattato come descritto nell'esempio 1



utilizzando 200 mg di sodio nitrito. Il prodotto ottenuto mostra caratteristiche di solfatazione simili al K5-N,O-supersolfato di partenza e un peso molecolare medio di 5.000 circa misurato tramite viscosimetria ed è costituito da una miscela in cui la specie preponderante è un dodecasaccaride di formula I° in cui m è 5 e X' è CH<sub>2</sub>OH.

#### ESEMPIO 3

Un grammo di K5 N,O-supersolfato ottenuto come descritto nella PREPARAZIONE IV viene trattato come descritto nell'esempio 1 utilizzando 160 mg di sodio nitrito. Il LMW-K5-N,O-supersolfato così ottenuto mostra caratteristiche di solfatazione simili al K5-N,O-supersolfato di partenza, un peso molecolare medio di 6.000 circa misurato tramite viscosimetria ed è costituito da una miscela in cui la specie preponderante è un tetradecasaccaride di formula I° in cui m è 6 e X' è CH<sub>2</sub>OH.

#### ESEMPIO 4

##### *(a) Sale di tetrabutylammonio del LMW-K5-N-solfato*

Una soluzione di 500 mg di LMW-K5-N-solfato ottenuto come descritto nella PREPARAZIONE III in 50 ml di acqua viene termostata a 4°C, quindi passata su resina a scambio ionico IR 120<sup>+</sup> preconditionata con acqua a 4°C. L'eluato ottenuto, consistente in 125 ml di una soluzione a pH di circa 2, viene neutralizzato con una soluzione di idrossido di tetrabutylammonio al 15% e lasciato a temperatura ambiente per un'ora, mantenendo il pH a 7 mediante aggiunta di idrossido di tetrabutylammonio al 15% e infine viene liofilizzato. Si ottiene così 1 g di sale di tetrabutylammonio di LMW-



K5-N-solfato.

*(b) LMW-K5-amina-O-supersolfatata*

Una soluzione contenente 1 g del sale così ottenuto in 20 ml di dimetilformamide viene posta a 55°C e trattata con 20 ml di dimetilformamide contenente 1,7 g di addotto piridina.SO<sub>3</sub>. La reazione a 55°C viene continuata per tutta la notte poi alla miscela sono aggiunti 40 ml di acqua. Dopo neutralizzazione con NaOH 1N, il prodotto è precipitato con 3 volumi di acetone saturo di NaCl e posto a 4°C per una notte. Il precipitato è recuperato per filtrazione su guch G4 e quindi ultrafiltrato con sistema Millipore TFF da 1000 D e seccato a pressione ridotta. Si ottengono così 683,2 mg di LMW-K5-amina-O-supersolfatata costituita da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un decasaccaride di formula III'', un cui m è 4, per un grado di solfatazione di circa 2,9.

*(c) LMW-K5-N,O-supersolfatato*

A una soluzione di 500 mg della LMW-K5-amina-O-supersolfatata ottenuta nel passaggio (b) in 30 ml di acqua vengono aggiunti 800 mg di carbonato sodico, poi alla miscela così ottenuta vengono aggiunti 800 mg di addotto piridina.SO<sub>3</sub> in forma solida poco per volta in 4 ore. La miscela di reazione viene tenuta a 55°C per tutta la notte, quindi viene fermata portando il pH a 7 con HCl 0,1N. Dopo ultrafiltrazione su membrana da 1000 D vengono aggiunti 3 volumi di acetone saturo di cloruro sodico e il precipitato è recuperato per centrifugazione a 5000 rpm per 5'. Si ottengono così 502 mg di LMW-K5-N,O-supersolfatato, con un peso molecolare medio di circa 4.100 misurato tramite

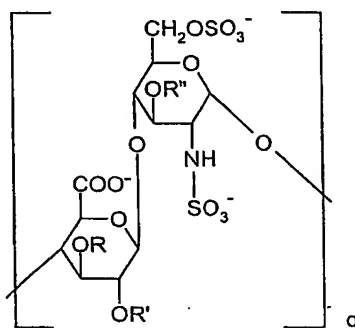
viscosimetria, costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un decasaccaride di formula I'' in cui  $m$  è 4, con un grado di solfatazione di circa 3,9.

#### ESEMPIO 5

Un grammo di LMW-K5-N-solfato ottenuto come descritto nella PREPARAZIONE III viene sottoposto ai passaggi (a) e (b) come descritto nell'esempio 4. La LMW-K5-amina-O-supersolfatata viene recuperata per precipitazione con 3 volumi di acetone saturato con NaCl, dissoluzione del precipitato ottenuto in acqua, ultrafiltrazione su membrana da 1.000 D e liofilizzazione. Il prodotto così ottenuto è una LMW-K5-amina-O-supersolfatata avente un peso molecolare medio di 3.600 circa misurato tramite viscosimetria ed è costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un decasaccaride di formula III'' in cui  $m$  è 4.

## RIVENDICAZIONI

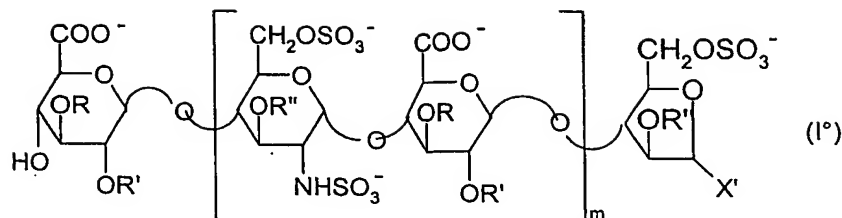
1. Un LMW-K5-N,O-supersolfatato avente un peso molecolare medio da circa 3.000 a circa 6.000 e un grado di solfatazione da 3,2 a 4.
2. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato della rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto di essere costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante ha la formula I



(I)



- in cui q è 4, 5, 6, 7 o 8, R, R' e R'' rappresentano idrogeno o un gruppo  $\text{SO}_3^-$ , per un grado di solfatazione da 3,2 a 4, e il catione corrispondente è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.
3. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato della rivendicazione 1 o 2, avente un peso molecolare medio di 3.750-4.250.
  4. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato della rivendicazione 1 o 2, avente un peso molecolare medio di 4.750-5.250.
  5. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato della rivendicazione 1 o 2 avente un peso molecolare medio di 5.750-6.250.
  6. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato della rivendicazione 1 o 2, caratterizzato dal fatto di essere costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula I°



in cui R, R' e R'' sono idrogeno o  $\text{SO}_3^-$ , X' rappresenta un gruppo formile o idrossimetile, per un grado di solfatazione da 3,2 a 4, m rappresenta 4, 5 o 6 e il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

7. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato secondo la rivendicazione 6, avente un peso molecolare medio di 3.750-4.250.

8. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato secondo la rivendicazione 6, avente un peso molecolare medio di 4.750-5.250.

9. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato secondo la rivendicazione 6, avente un peso molecolare medio di 5.750-6.250.

10. Un LMW-K5-N,O-supersolfatato secondo una delle rivendicazioni da 1 a 9, avente un grado di solfatazione da 3,5 a 4.

11. Un LMW-K5-N,O-supersolfatato secondo una delle rivendicazioni da 1 a 9, avente un grado di solfatazione da 3,5 a 3,9.

12. Procedimento per la preparazione di un LMW-K5-N,O-supersolfatato avente un grado di solfatazione da 3,2 a 4, caratterizzato dal fatto che

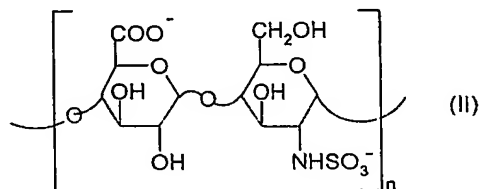
(a) si tratta un LMW-K5-N-solfato ottenuto per depolimerizzazione nitrosa di un K5-N-solfato e successiva riduzione, in forma acida, con una base organica terziaria o quaternaria, lasciando la miscela di reazione

a sé per un periodo di tempo di 30-60 minuti, mantenendo il pH della soluzione a un valore di 7 e si isola il suo sale con detta base organica;

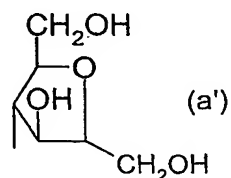
(b) si tratta detto sale di base organica di detto polisaccaride con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione;

(c) si tratta il prodotto così ottenuto con un reattivo di N-solfatazione; e si isola il LMW-K5-N,O-supersolfato così ottenuto.

13. Procedimento secondo la rivendicazione 12, caratterizzato dal fatto che come materiale di partenza si usa un LMW-K5-N-solfato costituito da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula II



in cui  $n$  è un numero intero da 2 a 20, contenente, all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene, un'unità 2,5-anidromannitolo di struttura (a')



e il catione corrispondente è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

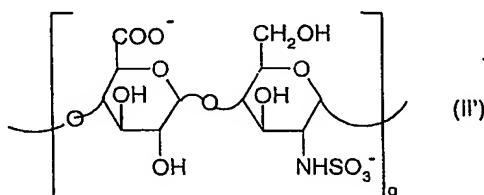
14. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 12 e 13, caratterizzato dal fatto che detta riduzione è effettuata con boroidruro di

sodio.

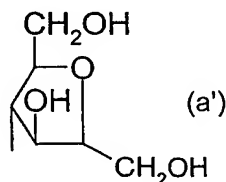
15. Procedimento secondo una delle rivendicazioni da 12 a 14, caratterizzato dal fatto che detto K5-N-solfato di partenza è privo di sostanze lipofile.

16. Procedimento secondo una delle rivendicazioni da 12 a 15, caratterizzato dal fatto che nel passaggio (a) il LMW-K5-N-solfato di partenza viene usato sotto forma del suo sale di sodio.

17. Procedimento secondo una delle rivendicazioni da 12 a 16, caratterizzato dal fatto che detto K5-N-solfato di partenza è costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula II'



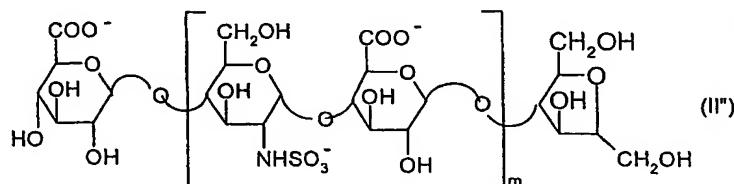
in cui  $q$  è 4, 5, 6, 7 o 8, contenente all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene, un'unità 2,5-anidromannitolo di struttura (a')



e il catione corrispondente è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

18. Procedimento secondo una delle rivendicazioni da 12 a 17,

caratterizzato dal fatto che detto K5-N-solfato di partenza è costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula II''



in cui m rappresenta 4, 5 o 6 e il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

19. Procedimento secondo una delle rivendicazioni da 12 a 18, caratterizzato dal fatto che il LMW-K5-N,O-supersolfatato è ottenuto sotto forma di sale di sodio e eventualmente trasformato in un altro sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

20. Una LMW-K5-amina-O-supersolfatata ottenibile mediante i passaggi (a) e (b) del procedimento secondo una delle rivendicazioni da 12 a 19, o un suo sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

21. Una LMW-K5-amina-O-supersolfatata avente un grado di solfatazione da 2,2 a 3, o un suo sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

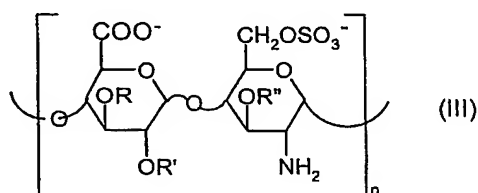
22. Una LMW-K5-amina-O-supersolfatata secondo una delle rivendicazioni 20 e 21, avente un peso molecolare medio da circa 3.500 a circa 11.000, o un suo sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

23. Una LMW-K5-amina-O-supersolfatata secondo una delle rivendicazioni da 20 a 22, avente un grado di solfatazione da 2,2 a 3 e un

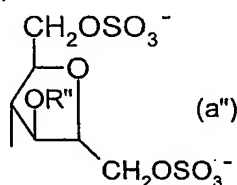
peso molecolare medio da 3.500 a 5.200.

24. Una LMW-K5-amina-O-supersolfatata secondo una delle rivendicazioni da 20 a 23, sostanzialmente priva di gruppi N-acetile.

25. Una LMW-K5-amina-O-supersolfatata secondo una delle rivendicazioni da 20 a 24, caratterizzata dal fatto di essere costituita da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula III



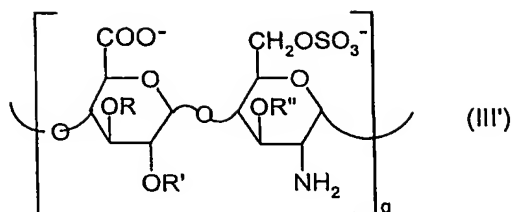
in cui R, R' ed R'' rappresentano idrogeno o un gruppo  $\text{SO}_3^-$ , n è un numero intero da 3 a 20, contenente all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene, un'unità 2,5-anidromannitolo solfatata di struttura (a'')



per un grado di solfatazione da 2,2 a 3, e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

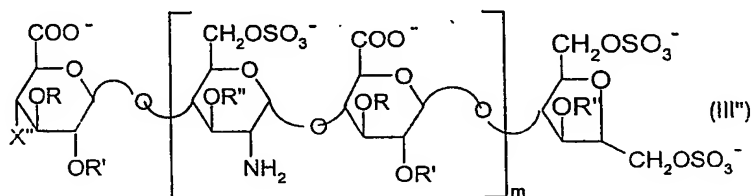
26. La LMW-K5-amina-O-supersolfatata della rivendicazione 25, caratterizzata dal fatto di essere costituita da una miscela in cui la specie preponderante è un composto di formula III'





in cui  $q$  è 4, 5, 6, 7 o 8 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

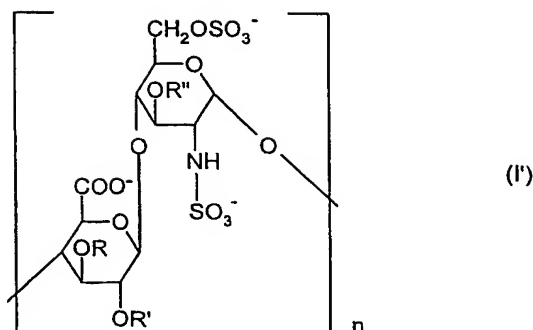
27. La LMW-K5-amina-O-supersolfatata della rivendicazione 26, caratterizzata dal fatto di essere costituita da una miscela in cui la specie preponderante è un composto di formula III''



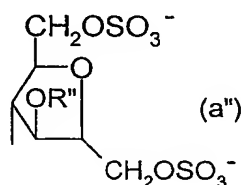
in cui  $R$ ,  $R'$  e  $R''$  sono idrogeno o  $\text{SO}_3^-$ ,  $X''$  è  $\text{OH}$  o  $\text{OSO}_3^-$ , per un grado di solfatazione da 2,2 a 3,  $m$  è 4, 5 o 6 e il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

28. Un LMW-K5-N,O-supersolfatato ottenibile secondo il procedimento delle rivendicazioni da 12 a 19.

29. Un LMW-K5-N,O-supersolfatato costituito da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la struttura I'

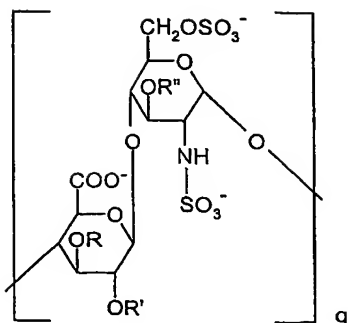


in cui  $n$  è un numero intero da 2 a 20,  $R$ ,  $R'$  e  $R''$  rappresentano idrogeno o un gruppo  $\text{SO}_3^-$ , e in cui l'estremità riducente della maggior parte di dette catene possiede la struttura ( $a''$ )



in cui  $R''$  è idrogeno o un gruppo  $\text{SO}_3^-$  per un grado di solfatazione da 3,2 a 4 e il catione corrispondente è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

30. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato della rivendicazione 29, caratterizzato dal fatto di essere costituito da una miscela in cui la specie preponderante è un composto di formula I

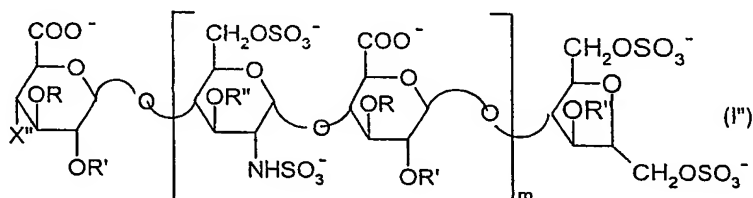


(I)



dove  $q$  è 4, 5, 6, 7 o 8 e il catione corrispondente è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

31. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato della rivendicazione 31, caratterizzato dal fatto di essere costituito da una miscela in cui la specie preponderante è un composto di formula I''



(I'')

in cui  $m$  è 4, 5, 6,  $R$ ,  $R'$  e  $R''$  sono idrogeno o  $\text{SO}_3^-$ ,  $X''$  è  $\text{OH}$  o  $\text{OSO}_3^-$ , per un grado di solfatazione da 3,2 a 4 e il catione corrispondente è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

32. Un LMW-K5-N,O-supersolfatato secondo una delle rivendicazioni da 28 a 31, caratterizzato dal fatto che detto catione è lo ione di un metallo alcalino, alcalino-terroso, di ammonio,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{tetraalchilammonio}$ , alluminio e zinco.

33. Il LMW-K5-N,O-supersolfatato della rivendicazione 32, caratterizzato dal fatto che detto catione è lo ione sodio, calcio o

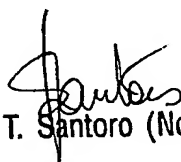
tetrabutylammonio.

34. Un LMW-K5-N,O-supersolfatato secondo una delle rivendicazioni da 28 a 33, caratterizzato da un grado di solfatazione da 3,5 a 4.

35. Un LMW-K5-N,O-supersolfatato secondo una delle rivendicazioni da 28 a 33, caratterizzato da un grado di solfatazione da 3,5 a 3,9.

36. Una composizione farmaceutica comprendente, in qualità di un suo principio attivo, un LMW-K5-N,O-supersolfatato secondo una delle rivendicazioni da 1 a 11 o da 28 a 35, in miscela con un eccipiente farmaceutico.

37. Una composizione farmaceutica comprendente, in qualità di un suo principio attivo, una LMW-K5-amina-O-supersolfatata secondo una delle rivendicazioni da 20 a 27, in miscela con un eccipiente farmaceutico.

  
Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**